

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.53.016

[http://www.crter.org]

郑晓筠, 罗倩欣, 陈倩琪, 熊喜峰, 刘玉荣, 马宁芳. 肝硬化部分切除后肝再生及结构变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(53):9196-9202.

肝硬化部分切除后肝再生及结构变化*

郑晓筠, 罗倩欣, 陈倩琪, 熊喜峰, 刘玉荣, 马宁芳(广州医科大学基础学院组织学与胚胎学教研室, 广东省广州市 510182)

文章亮点:

- 1 肝硬化为肝脏不可逆病理改变, 临床上多使用保守治疗以控制肝硬化进程。
- 2 文章的创新之处在于立足肝脏自身强大的再生能力, 尝试用肝部分切除诱导残余肝内具再生能力的细胞增殖以重建肝脏结构。结果显示, 早期肝硬化部分切除可明显改善甚至逆转硬化肝的组织结构。
- 3 肝硬化部分切除后肝内有效增殖细胞数的相对减少及肝再生反应滞后等因素, 是应用该方法治疗时临床上不可忽视的重要环节, 在实际应用中应根据肝功能代偿能力等指标进行科学评估。

关键词:

器官移植; 器官移植基础实验; 肝硬化; 四氯化碳; 小鼠; Masson 染色; 肝部分切除; 肝再生; 结蛋白; α -平滑肌肌动蛋白; 5-溴脱氧尿核苷; 省级基金

主题词:

肝硬化; 肝切除术; 肝再生; 结蛋白; 肌动蛋白类

基金资助:

广东省 2011 年大学生创新实验项目(2011)*

摘要

背景: 肝脏自身具有强大的再生能力, 临床资料显示大部分肝癌患者合并有肝硬化, 切除肿瘤后肝脏质量可逐渐恢复, 提示硬化的肝脏仍具备修复潜能。

目的: 尝试用肝部分切除方法诱导小鼠硬化肝组织内具再生能力的细胞增殖, 观察再生肝脏的结构变化。

方法: 使用 CCl_4 皮下注射方法制备小鼠肝硬化模型。对肝硬化小鼠行肝部分切除, 于切除后 1, 3, 5, 7, 10, 14 及 21 d 取小鼠肝组织并称质量。观察比较肝部分切除后不同时间小鼠再生肝组织的结构变化; 评估肝再生率; 免疫组化方法分析肝星形细胞标志分子结蛋白及肝星形细胞活化标志分子 α -平滑肌肌动蛋白的表达变化; 5-溴脱氧尿核苷标记技术对增殖细胞进行定性、定位。

结果与结论: 肝硬化小鼠肝部分切除后第 1, 3, 5, 7, 14, 21 天肝再生率分别为 6.58%, 22.03%, 21.39%, 29.05%, 45.22%, 50.98%。苏木精-伊红染色和 Masson 染色显示 CCl_4 注射 8 周后呈早期肝硬化病理改变, 肝部分切除后肝组织结构逐步改善。免疫组化结果显示肝部分切除后第 1 天再生肝组织内结蛋白表达减少, 但第 3 天至第 14 天呈上升趋势, 21 d 则明显减少; 肝再生过程中各时间点 α -平滑肌肌动蛋白表达依时递减。5-溴脱氧尿核苷阳性细胞在肝部分切除后 1-7 d 主要为肝细胞, 肝部分切除后 14-21 d 阳性细胞定位于肝血窦内皮及窦腔内。结果表明早期肝硬化小鼠大部肝切除后 3 d 出现明显的再生反应, 并逐步恢复正常的肝组织结构。

Regeneration and structural changes of mouse cirrhotic liver after partial hepatectomy

Zheng Xiao-jun, Luo Qian-xin, Chen Qian-qi, Xiong Xi-feng, Liu Yu-rong, Ma Ning-fang (Department of Histology and Embryology, School of Basic Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Liver possesses a powerful regenerative capacity. It is reported that the most patients suffering from hepatocellular carcinoma are accompanied with liver cirrhosis. The liver weight can be gradually restored after tumor resection, which indicated a regenerative potential of cirrhosis liver.

OBJECTIVE: To try to use partial hepatectomy to induce proliferation of cells with regeneration capacity in cirrhotic liver of mice, and to observe the structural changes of regenerated liver.

METHODS: The liver cirrhosis model of mouse was produced by injecting CCl_4 liquid subcutaneously. The mice with liver cirrhosis were subjected to partial hepatectomy. The residual liver was dissected and weighted at 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days after partial hepatectomy. The structural changes of regenerating livers were compared after partial hepatectomy at various time points. Liver regeneration rate was evaluated. Immunohistochemical method was used to analyze desmin and α -smooth muscle actin expression in the hepatic satellite cells. The 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation labeling method was used to exhibit and localize the regenerating cells.

RESULTS AND CONCLUSION: The liver regeneration rates of the mice with liver cirrhosis at the 1, 3, 5, 7, 14,

郑晓筠, 女, 1990 年生, 广东省东莞市人, 广州医科大学临床学院在读学士, 主要从事肝硬化方面的研究。

383271008@qq.com

通讯作者: 马宁芳, 博士, 教授, 广州医科大学基础学院组织学与胚胎学教研室, 广东省广州市

510182

nfma@gzhmc.edu.cn.

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)53-09196-07

修回日期: 2013-09-19

(201304019/G · Q)

Zheng Xiao-jun, Department of Histology and Embryology, School of Basic Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China
383271008@qq.com

Corresponding author: Ma Ning-fang, M.D., Professor, Department of Histology and Embryology, School of Basic Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China
nfma@gzhmc.edu.cn

Accepted: 2013-09-19

21 days after the partial hepatectomy were 6.58%, 22.03%, 21.39%, 29.05%, 45.22%, and 50.98% respectively. The results of hematoxylin-eosin staining as well as Masson staining showed the pathological early cirrhosis features of the liver after CCl_4 treatment for 8 weeks and the structure of residual livers improved gradually after partial hepatectomy. Immunohistochemical results demonstrated that the expression of desmin in regenerating liver was decreased at 1 day after partial hepatectomy, but showed an uptrend from 3 to 14 days and decreased at 21 days. The expression of α -smooth muscle actin decreased gradually at every time point after partial hepatectomy. The 5-bromo-2-deoxyuridine-positive nucleus localized in hepatocytes at 1–7 days and mainly localized in hepatic sinusoid endothelium and intracavity at 14–21 days after partial hepatectomy. The regenerative reaction of mouse cirrhotic liver appeared at 3 days after partial hepatectomy and the structure of normal regenerating liver will be improved and restored gradually.

Subject headings: liver cirrhosis; partial hepatectomy; liver regeneration; desmin; actins

Funding: the College Students' Innovative Experimental Projects of Guangdong Province (2011)*

Zheng XJ, Luo QX, Chen QQ, Xiong XF, Liu YR, Ma NF. Regeneration and structural changes of mouse cirrhotic liver after partial hepatectomy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(53):9196-9202.

0 引言 Introduction

肝硬化是由多种因素引发的肝脏不可逆病理改变,临床上多使用保肝护肝等对症治疗来改善肝功能、延缓肝硬化进程^[1]。晚期肝功能失代偿则选择肝移植,然而肝供体极为有限,严重制约了晚期肝硬化的治疗,因此,控制肝硬化进程、缓解甚至逆转肝病理变化是临床治疗的目标^[2]。

肝硬化的严重结局可转化为肝癌,统计学资料显示约85%的肝癌患者合并有肝硬化^[3-4],临床首选手术切除,大多数患者术后可逐步恢复肝脏功能^[5-6],说明硬化的肝脏仍保留有一定的修复潜能,因此立足肝脏的再生能力,用肝部分切除方法诱导残余肝内具再生能力的细胞增殖、修复肝脏的结构及功能,不失为治疗早期肝硬化的又一种选择。然而肝硬化状态下实施部分切除,其所诱导的肝再生状况、再生肝组织结构正常与否目前未见报道。

文章应用 CCl_4 诱导的肝硬化小鼠模型,通过肝部分切除诱导肝再生反应,评估肝硬化小鼠肝再生能力,观察再生肝组织的结构变化,为临床肝硬化治疗提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2012年1至12月在广州医科大学基础学院组织学与胚胎学教研室完成。

材料:

实验动物: 健康成年昆明雄鼠60只,体质量28–35 g,清洁级,由广东省南方医科大学实验动物中心提供,许可证号: SCXK粤2011。

实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

小鼠肝硬化部分切除后肝再生及其结构变化实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
兔抗结蛋白多克隆抗体、兔抗 α -平滑肌肌动蛋白多克隆抗体、抗5-溴脱氧尿核苷单克隆抗体	NewMarker 公司产品
兔二步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
5-溴脱氧尿核苷	Sigma 公司产品
CCl_4 (500 mL/瓶)	上海化学试剂一厂产品
粟米油	市售
显微数码摄像分析系统	OLYMPUS 公司

方法:

肝硬化小鼠的肝再生模型制作及取材: 将 CCl_4 与食用粟米油以1:1比例混合备用。健康雄性昆明小鼠($n=60$)皮下注射 CCl_4 -粟米油混合液(6 mL/kg), 2次/周, 共8周。随机选取5只小鼠,取肝组织制作切片,常规苏木精-伊红染色,根据临床肝纤维化诊断分期标准,进行肝组织病理学鉴定^[7-8]。出现肝实质广泛性破坏、肝内纤维增生、假小叶形成为早期肝硬化判断依据,进一步对肝硬化小鼠实施肝部分切除。以10 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉肝硬化小鼠,按Higgins等^[9]经典方法进行肝部分切除动物模型改良,切除小鼠肝脏左叶、右叶,保留中叶及胆囊、尾叶。在剑突下取正中切口,轻轻挤出肝脏左叶于肝蒂部结扎后切除,然后从剑突右下方轻轻挤出右叶和后叶,并把右叶和尾叶一起结扎切除。称取并记录切除的肝左叶、右叶及尾叶质量(被切除的各叶质量约占原肝质量的60%),关闭腹腔。于肝部分切除后1, 3, 5, 7, 14, 21 d腹膜下注射5-溴脱氧尿核苷50 mg/kg, 2 h后取小鼠残余肝组织并称质量,将各时间点所取的肝组织置于体积分数4%甲醛溶液中固定,常规方法制做肝石蜡切片备用,另一部分置液氮冻存,提取蛋白备用。

肝再生率计算方法^[10]:

$$\text{肝再生率} = \frac{[\text{造模后取材时的肝质量} - (\text{造模前总肝质量} - \text{切除肝质量})]}{\text{造模前总肝质量}} \times 100\%$$

根据造模前、造模后小鼠肝质量计算肝再生率,小

鼠总肝质量按5.5%体质量计算。

肝组织病理学检测：切片行常规苏木精-伊红染色、Masson 染色，光学显微镜下观察肝组织结构变化。

结蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白定性及定量检测、5-溴脱氧尿核苷显色：用免疫组织化学方法对结蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白进行定性检测，5-溴脱氧尿核苷免疫组织化学方法显示5-溴脱氧尿核苷阳性标记细胞。肝组织切片经熔蜡、水化、枸橼酸缓冲液抗原修复(5-溴脱氧尿核苷免疫组织化学染色切片需用4 mol/L HCl预处理)、30 g/L过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶10 min后滴加体积分数10%山羊血清封闭30 min，一抗 4℃冰箱过夜，PBS 冲洗后依次加二抗孵育1 h，DAB显色，苏木精复染、脱水、中性树胶封固，显微镜下观察。常规Western Blot方法定量检测结蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白表达。

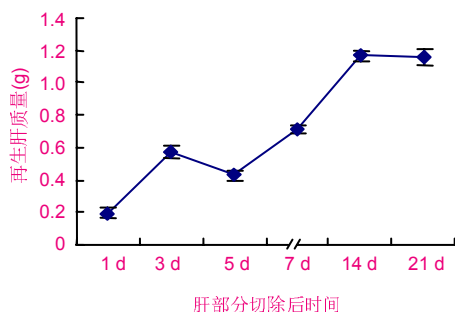
主要观察指标：肝再生率；肝组织病理学改变；肝星形细胞标志分子结蛋白及其活化分子 α -平滑肌肌动蛋白的定性、定量表达；5-溴脱氧尿核苷标记。

统计学分析：由本文作者使用SPSS 10.0软件对数据进行统计学处理。不同时间点肝再生率比较采用配对 t 检验，以 $P < 0.05$ 表示对比组之间差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验共选用雄性小鼠60只制作肝硬化模型，其中11只在造模过程中死亡，存活 49只，选取5只小鼠用于组织病理学鉴定，证明造模成功率为82%。剩余的44只早期肝硬化小鼠进一步实施肝大部切除，死亡4只，术后存活率88%。肝切除后第1, 3天分别取5只小鼠，其余时间点各取6只小鼠进行指标观察。

2.2 肝部分切除后的肝再生率 肝硬化小鼠肝部分切除后第3天肝质量明显回升，见图1。



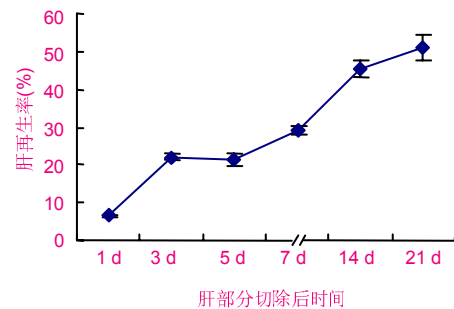
注：不同时间点再生肝的净质量，随术后修复时间的延长肝净质量逐渐增加。

图1 肝硬化小鼠肝部分切除后的再生肝质量

Figure 1 Liver mass of the mouse with liver cirrhosis after partial hepatectomy

肝部分切除后第1, 3, 5, 7, 10, 14, 21天肝再

生率分别为6.58%，22.03%，21.39%，29.05%，45.22%，50.98%，见图2。



注：肝部分切除后不同时间点肝再生率逐渐递增。

图2 肝硬化小鼠肝部分切除后的肝再生率

Figure 2 Liver regeneration rate of the mouse with liver cirrhosis after partial hepatectomy

2.3 肝部分切除前后肝组织的结构变化 见图3, 4。

苏木精-伊红染色结果显示，CCl₄皮下注射8周后小鼠肝小叶结构破坏，肝细胞有空泡样变及脂肪变，Masson染色显示肝小叶间胶原纤维增生并伸入肝小叶内形成间隔，与周围增生的纤维间隔互相连接、包绕分割原来的肝小叶形成假小叶，呈现出早期肝硬化改变。对肝硬化小鼠实施肝部分切除后第1-5天肝组织结构与造模前肝组织相比结构无明显变化；肝部分切除后第7天再生肝组织结构出现改善，随术后时间推移肝细胞脂肪变现象逐渐减少，肝小叶间增生的胶原纤维减少或消失，至肝部分切除后21 d肝小叶结构基本恢复正常。

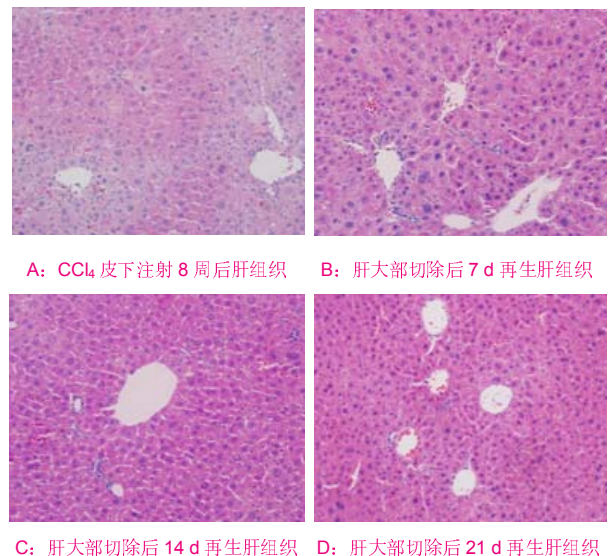


图3 肝硬化小鼠肝部分切除前后肝组织苏木精-伊红染色病理学变化($\times 200$)

Figure 3 Pathological changes of liver tissue of mice with liver cirrhosis before and after partial hepatectomy observed using hematoxylin-eosin staining ($\times 200$)

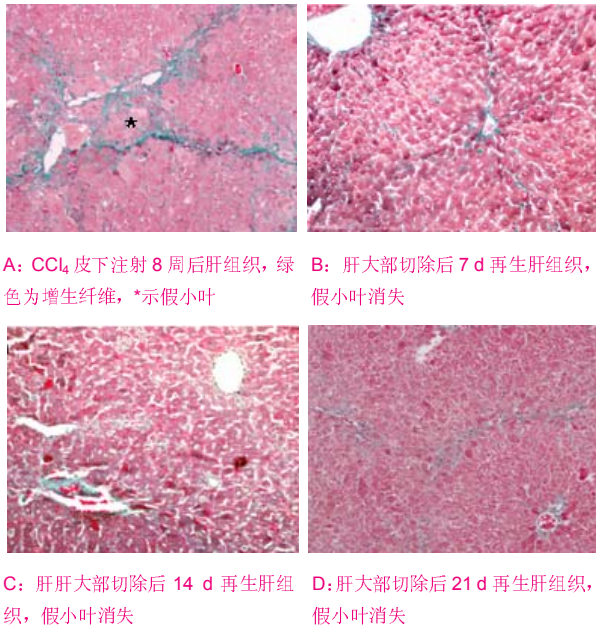
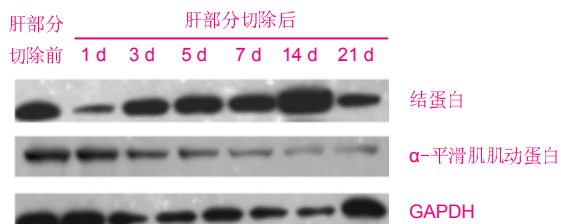


图 4 肝硬化小鼠肝部分切除前后肝组织 Masson 染色病理学变化(×200)

Figure 4 Pathological changes of liver tissue of mice with liver cirrhosis before and after partial hepatectomy using Masson staining (×200)

2.4 结蛋白、α-平滑肌肌动蛋白及5-溴脱氧尿核苷的定性、定量检测 蛋白印迹检测结果显示, 肝部分切除后第1天再生肝组织内结蛋白表达量明显低于切除前, 但切除后第3-14天结蛋白表达呈上升趋势, 21 d则明显减少, 见图5。

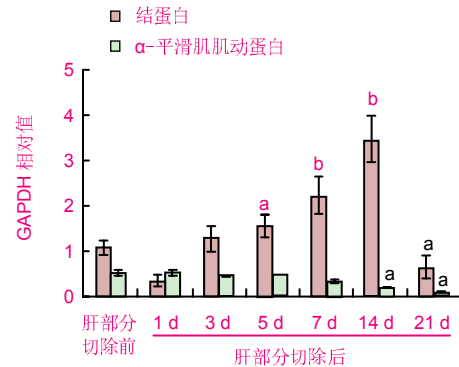


注: 肝硬化小鼠肝部分切除前及肝部分切除后不同时间点肝组织结蛋白及α-平滑肌肌动蛋白的 Western Blot 检测, GAPDH 为内参。

图 5 肝硬化小鼠肝部分切除前后结蛋白及α-平滑肌肌动蛋白印迹检测结果

Figure 5 Western blot assay of desmin and alpha-smooth muscle actin before and after partial hepatectomy in mice with liver cirrhosis

与硬化肝相比差异均有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肝部分切除后各时间点α-平滑肌肌动蛋白表达比切除前明显减少, 肝再生过程中α-平滑肌肌动蛋白表达依时递减, 与硬化肝相比肝部分切除后14 d及21 d的α-平滑肌肌动蛋白表达差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见图6。



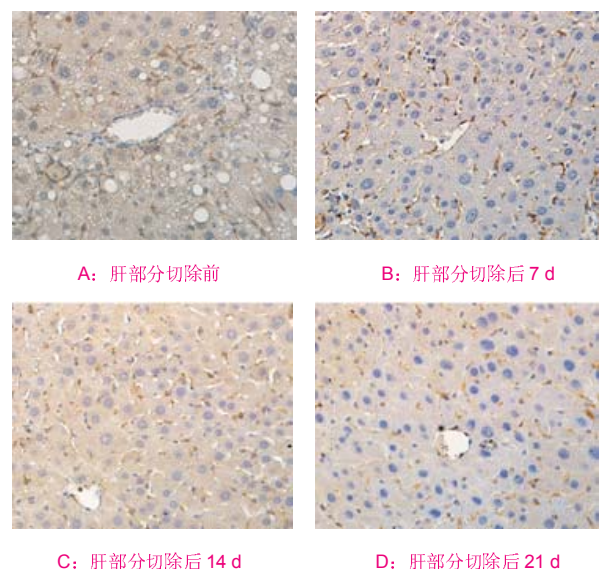
与肝部分切除前早期肝硬化组织相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

注: 结果显示, 肝部分切除后第 5, 7, 14 天再生肝组织内结蛋白表达量明显高于切除前, 但切除后 21 d 则明显减少($P < 0.05-0.01$)。与硬化肝相比肝部分切除后 14 d 及 21 d 的α-平滑肌肌动蛋白表达显著低于切除前($P < 0.05$)。

图 6 肝硬化小鼠肝部分切除前后结蛋白及α-平滑肌肌动蛋白印迹检测的相对表达结果

Figure 6 Western blot assay of relative expression of desmin and alpha-smooth muscle actin before and after partial hepatectomy in mice with liver cirrhosis

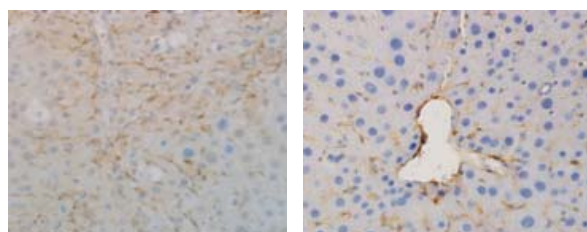
免疫组织化学检测结果显示, 结蛋白及α-平滑肌肌动蛋白阳性表达细胞均定位于肝血窦周围, 见图7-9。



注: 结蛋白免疫组化染色, 示结蛋白阳性星形细胞。

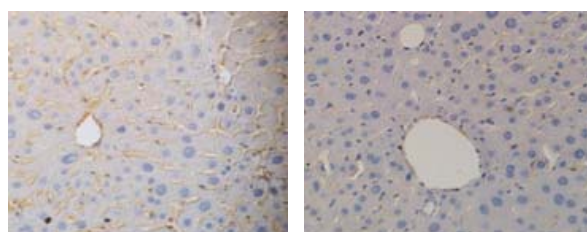
图 7 肝硬化小鼠肝部分切除前后肝组织结蛋白免疫组化染色结果(×400)

Figure 7 Immunohistochemical staining of desmin in the liver of mice with liver cirrhosis after partial hepatectomy (×400)



A: 肝部分切除前

B: 肝部分切除后 7 d



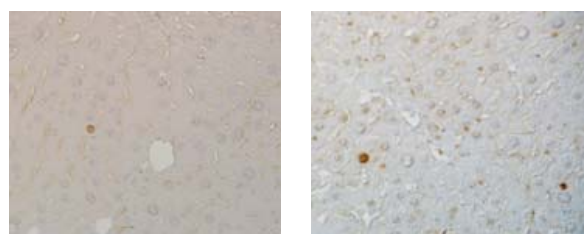
C: 肝部分切除后 14 d

D: 肝部分切除后 21 d

注: α -平滑肌肌动蛋白免疫组化染色, 示位于肝细胞周围的 α -平滑肌肌动蛋白阳性星形细胞。

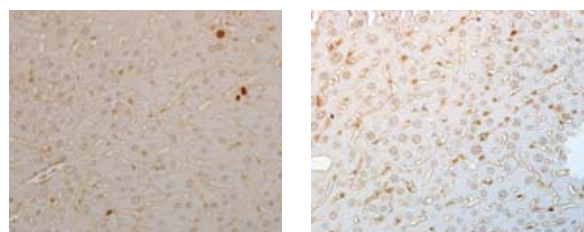
图 8 肝硬化小鼠肝部分切除前后 α -平滑肌肌动蛋白免疫组化染色结果($\times 400$)

Figure 8 Immunohistochemical staining of alpha-smooth muscle actin in the liver of mice with liver cirrhosis after partial hepatectomy ($\times 400$)



A: 肝部分切除前

B: 肝部分切除后 7 d



C: 肝部分切除后 14 d

D: 肝部分切除后 21 d

注: 5-溴脱氧尿核苷免疫组化染色, 棕色胞核为 5-溴脱氧尿核苷阳性细胞。

图 9 肝硬化小鼠肝部分切除前后 5-溴脱氧尿核苷免疫组化染色结果($\times 400$)

Figure 9 Immunohistochemical staining of 5-bromo-2-deoxyuridine in the liver of mice with liver cirrhosis after partial hepatectomy ($\times 400$)

3 讨论 Discussion

生理状态下肝为相对静止的器官,但在肝叶切除或其他原因所致的肝细胞缺失后,残余的肝实质细胞(成熟的肝细胞)及非实质细胞(包括胆管上皮细胞、肝血窦内皮细胞、枯否细胞及Ito细胞)将先后进入增殖状态以补充肝细胞数量、代偿肝脏功能^[11-12]。文献报道正常小鼠肝部分切除后30 min 内便有早期反应基因的表达,同时伴有转录因子STAT3、活性核因子 κ B的高表达,细胞的DNA合成加速,从部分肝切除到肝细胞DNA合成的启动只需10-12 h,合成高峰在术后24 h。肝大部切除后,残余的肝细胞平均历经3/2(约1.67)个增殖周期以完成肝的再生,整个过程持续 5-7 d^[13-17]。通常肝再生研究多采用Higgins等^[9]的大鼠肝大部切除模型,即切除肝左叶及中叶(占总肝质量的60%-70%),保留肝右叶及尾叶,近来也有许多研究将Higgins的肝大部切除模型用于小鼠肝再生研究^[12-14]。考虑到小鼠与大鼠胆道结构的差异,文章依照课题组改良后的肝大部切除方法,保留小鼠贴近胆囊的中叶以保证胆汁的正常流通,获得较为理想的手术成活率^[18]。肝质量/体质量比、肝再生率等指标是评估肝再生状况的常用指标,尤其是肝再生率排除了肝再生过程中体质量变化的影响,能比较准确的反映肝再生情况。本实验综合观察此2项指标,结果显示其变化趋势基本一致。已有的研究证实正常小鼠在实施肝脏部分切除后,肝脏可在7-10 d恢复原有的质量,完成再生过程^[19-20],本实验中肝硬化小鼠部分切除后肝再生率及肝质量/体质量比值变化相对缓慢,至术后21 d肝脏回复至原肝质量的50%以上,说明与正常小鼠相比,早期肝硬化部分切除可促进肝质量逐步恢复,尽管其再生的启动及速度均有延后。

肝星形细胞的激活及增殖是肝纤维化发生过程中的中心环节,一些因素如毒素类、病毒、氧化应激、坏死、细胞凋亡和生长因子均可诱导静止状态的肝星形细胞激活分化为肌成纤维样细胞,此外,肝血管周围成纤维细胞也可分化形成肌成纤维样细胞。活化后的肝星形细胞(即肌成纤维样细胞)的表型特点为高增殖及迁移能力,表达 α -平滑肌肌动蛋白及各种细胞外信号转导通路蛋白,并产生大量以胶原为主的细胞外基质成分和细胞因子,导致肝组织微环境及结构的变化^[21-22]。近年陆续有研究报道肝内胆管上皮细胞也参与肝星形细胞的活化和细胞外基质的生成,即肝内胆管上皮细胞同样与肝纤维化过程相关,提示病理状态下肝组织结构的异常变化是多细胞参与的一个复杂的过程,其最根本的原因是病理环境下各相关细胞的激活及分化^[23]。本实验肝硬化模型组织病理学检测结果表明CCl₄处理8周后小鼠肝实质内将出现明显的肝组织坏死、小叶间纤维组织增生及

典型的假小叶,达到早期肝硬化分期标准^[24-25],提示早期肝硬化模型建立成功。传统的观点认为肝硬化为肝脏的不可逆病变,本实验对肝硬化小鼠实施肝部分切除后发现术后再生时间的延长,原有的肝硬化病理结构、肝脂肪变及空泡样变、纤维增生等现象明显减弱甚至消失,至肝部分切除后21 d肝脏结构趋于正常,说明早期肝硬化组织病理改变可通过肝部分切除得以纠正,但其前提是有效控制肝硬变的诱因如化学损伤、病毒感染等。

结蛋白是肝星形细胞的标志分子,当肝星形细胞向肌成纤维样细胞转化后则表达 α -平滑肌肌动蛋白,故 α -平滑肌肌动蛋白阳性表达可做为肝星形细胞激活的标志^[26-29]。

本实验发现肝脏术后再生修复过程中结蛋白表达量依时递增,肝部分切除后14 d达峰值,至肝部分切除后21 d结蛋白表达量降低,提示肝星形细胞的增殖在肝部分切除后早期较活跃,肝硬化术后所启动的再生微环境中增殖的肝星形细胞可能参与了肝组织的重建。正常情况下肝脏 α -平滑肌肌动蛋白仅表达于血管壁平滑肌细胞及活化的肝星形细胞^[30-32],本实验中早期肝硬化部分切除后 α -平滑肌肌动蛋白阳性表达与结蛋白阳性细胞增殖并不同步,随着术后肝修复时间的延长 α -平滑肌肌动蛋白表达则逐渐减少,其可能的原因是:①该再生环境可刺激肝星形细胞的增殖但抑制其活化。②增殖的肝星形细胞向肝实质细胞或其他细胞方向分化。既往对肝星形细胞的研究主要关注于其在肝纤维化进程中的作用,认为在损伤因子刺激下活化的肝星形细胞是肝纤维化发展的核心环节。近来不断有证据证实肝星形细胞具有促进肝组织再生的作用,研究发现肝星形细胞活化受限的小鼠在肝损模型中随损伤持续加重,肝组织修复明显受限^[32];另有报道在胚胎干细胞诱导分化为肝细胞体系中,将胚胎干细胞与永生化肝星形细胞等肝间质细胞共培养,诱导分化效率明显提高^[33-34],提示肝星形细胞的功能状态与肝细胞的分化成熟及功能活性密切相关,肝星形细胞可能参与肝细胞的分化和成熟,上述观点与本文结果吻合,具体机制仍需深入探讨。

5-溴脱氧尿核苷可代替胸腺嘧啶在DNA合成期选择性的掺入到处于细胞周期S期的细胞单链DNA核苷酸序列中,做为DNA前体胸腺嘧啶核苷的类似物,5-溴脱氧尿核苷能准确反映细胞的增殖状态,对研究细胞动力学有重要意义^[35]。

正常小鼠肝大部切除后1 d即出现5-溴脱氧尿核苷阳性标记细胞^[18],本实验采用5-溴脱氧尿核苷标记技术定性观察肝内再生细胞,结果发现术后5 d肝内逐渐出现5-溴脱氧尿核苷阳性标记细胞,表明早期肝硬化部分切除同样能启动再生反应但其再生反应的启动较正常小鼠慢。结合肝组织结构特征及5-溴脱氧尿核苷阳性标记细胞的定位进行判断,肝部分切除后第1周各时间点

内的5-溴脱氧尿核苷阳性反应主要定位于肝细胞,而肝部分切除后14-21 d 5-溴脱氧尿核苷阳性细胞主要为血管内皮细胞、肝星形细胞及肝血管腔内的血细胞。本实验未对各5-溴脱氧尿核苷阳性细胞进一步分型,但根据组织学形态及位置判定,肝硬化肝部分切除后肝实质细胞最先启动增殖反应,其后则通过肝非实质细胞的增殖来补充和完成肝组织的再生。

实验结果表明早期肝硬化部分切除可明显改善甚至逆转硬化肝的组织结构,然而肝硬化部分切除后肝内有效增殖细胞数的相对减少及肝再生反应滞后等因素,是临床上不可忽视的重要环节,在实际应用中应根据肝功能代偿能力等指标进行科学评估。肝硬化早期进行手术治疗,结合保肝护肝药物,将有望延缓或阻断肝硬化进程。

作者贡献: 郑晓筠、罗倩欣、陈倩琪负责实验设计,郑晓筠、罗倩欣、陈倩琪、熊喜峰负责实验实施,熊喜峰及刘玉荣负责实验评估,郑晓筠、罗倩欣、陈倩琪负责资料收集及成文,马宁芳审校并对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 肝假小叶-肝硬化时肝内纤维组织广泛增生,把原有的正常肝小叶分隔、包绕为大小不一、圆形或类圆形的肝细胞团块,形似肝小叶,小叶内中央静脉常偏位或缺如,称假小叶,为肝硬化的一个重要形态学标志。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 范婷婷,谢渭芬.肝纤维化和肝硬化治疗进展[J].国际消化杂志, 2010,30(6): 349-351.
- [2] Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. J Clin Invest. 2013;123(5):1887-1901.
- [3] 汤钊猷.肝癌研究进展[J].中国肿瘤,2001,10(1): 37-40.
- [4] 吴孟超,陈汉,沈锋.原发性肝癌的外科治疗一附5524例报告[J].中华外科杂志,2001,39(1):25-28.
- [5] Nagasue N, Kohno H, Chang YC, et al. Liver resection for hepatocellular carcinoma. Ann Surg. 1993; 217(4): 375-384.
- [6] Moser MA, Kneteman NM, Minuk GY. Research towards safer resection of the cirrhotic liver. HBP Surg. 2000;11: 285-297.
- [7] Bravo E, D'Amore E, Ciaffoni F, et al. Evaluation of the spontaneous reversibility of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rabbits. Lab Anim. 2012;46(2):122-128.
- [8] Mederacke I. Liver fibrosis-mouse models and relevance in human liver diseases. Z Gastroenterol. 2013;51(1):55-62.

- [9] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med.* 1931;12:186-202.
- [10] Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007; 213(2):286-300.
- [11] 陈栋,吴力群,曹景玉,等.大鼠肝切除术后肝损伤程度与肝再生状态的动态对比研究[J]. *中华肝胆外科杂志*,2002,8(6):354-357.
- [12] Jones LD, Nielsen MK, Britton RA. Genetic variation in liver mass, body mass, and liver: body mass in mice. *J Anim Sci.* 1992;70: 2999-3006.
- [13] Tan X, Behari J, Cieply B, et al. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology.* 2006; 131: 1561-1572.
- [14] Inderbitzin D, Gass M, Beldi G, et al. Magnetic resonance imaging provides accurate and precise volume determination of the regenerating mouse liver. *J Gastrointest Surg.* 2004; 8: 806-811.
- [15] Kumar S, Zou Y, Bao Q, et al. Proteomic analysis of immediate-early response plasma proteins after 70% and 90% partial hepatectomy. *Hepatol Res.* 2012. doi: 10.1111/hepr.12030. [Epub ahead of print]
- [16] Hayashi H, Nagaki M, Imose M, et al. Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Liver Int.* 2005; 25:162-170.
- [17] Fujita J, Marino MW, Wada H, et al. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery.* 2001;129: 48-54.
- [18] 方芳,徐丽萍,董沛杰,等.不同性别小鼠肝大部切除术后肝再生能力的比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2010,14(53): 9909-9912.
- [19] Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology.* 2000;31: 35-42.
- [20] Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int.*2008;28:3-11.
- [21] Safadi R,Friedman SL.Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation.*Med Gen Med.* 2002;4(3):27-32.
- [22] Benyon RC,Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 2000; 46(4):443-446.
- [23] Reeves HL,Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells- a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:808-826.
- [24] 熊喜峰,何伟业,谢湘梅,等.β-catenin在四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化过程中的定位表达及意义[J]. *解剖学报*,2012,43(1): 97-102.
- [25] Hohme S, Hengstler JG, Brulport M. Mathematical modelling of liver regeneration after intoxication with CCl₄(4). *Chem Biol Int.* 2007;168(1):74-93.
- [26] Hora C, Romanque P, Dufour JF. Effect of sorafenib on murine liver regeneration. *Hepatology.* 2011;53(2):577-56.
- [27] Safadi R,Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *Med Gen Med.* 2002;4(3):27-32.
- [28] Kocabayoglu P, Friedman SL.Cellular basis of hepatic fibrosis and its role in inflammation and cancer. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013;5:217-230.
- [29] Berg T, DeLanghe S, Al Alam D, et al. β-catenin regulates mesenchymal progenitor cell differentiation during hepatogenesis. *J Surg Res.* 2010;164(2):276-285.
- [30] Asahina K, Tsai SY, Li P, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology.* 2009;49(3):998-1011.
- [31] Van Rossen E, Vander Borgh S, van Grunsven LA, et al. Vinculin and cellular retinol-binding protein-1 are markers for quiescent and activated hepatic stellate cells in formalin-fixed paraffin embedded human liver. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131(3):313-325.
- [32] Zhao L, Burt AD. The diffuse stellate cell system.*J Mol Histol.* 2007;38(1):53-64.
- [33] Kalinichenko VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, et al. Foxf1+/-mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl₄ injury. *Hepatology* 2003;37: 107-117.
- [34] Thomas RJ, Bhandari R, Barrett DA, et al. The effect of three dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs.* 2005;181:67-79.
- [35] Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine:a new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982;218:474-479.